и сохранность молодняка на 15-32,9%.

Включение гипериммунной сыворотки в состав комплексного препарата сероизатизон увеличивает его профилактическую эффективность при респираторных заболеваниях у телят на 2,7% в сравнении с изатизоном.

Препараты изатизон и сероизатизон можно применять в крупных животноводческих хозяйствах для профилактики респираторных заболеваний телят во время комплектования поголовья.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты изучения профилактической активности изатизона in vitro в культуре клеток и изатизона и сероизатизона in vivo на телятах в условиях животноводческих комплексов.

SUMMARY

The results of study of antiviral activity of izatison in vitro in cell culture and both definition of preventive and thaeropeutical efficiency of izatison and seroizatison in experiences in vivo with use calves on big farms.

Литература

1. Бессарабов Б.Ф. Влияние изатизона на естественную резистентность организма животных /Б.Ф. Бессарабов и др.// Ветеринария. 1994. №5. С. 50-51.
2. Гулюкин М.И. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий против инфекционных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах российской Федерации/ М.И. Гулюкин, К.П. Юров, Ю.Д. Караваев и др. М., 2007. 14 с.
3. Крюков Н.Н. Инфекционный ринотрахеит пустулёзный вульвовагинит крупного рогатого скота // Итоги науки и техники/ Животноводство и ветеринария. М., 1980. С. 32-113.
4. Юров К.П. Распространение инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота в различных регионах России /К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, О.Г. Петрова, О.В. Майджи// Тр. ВИЭВ. М. 2003. Т.73. С. 15-22.
5. Babiuk L.A. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection / L.A. Babiuk, S. Van Drunen Littel-van den Hurk, S.K. Tikoo // Vet. Microbiol. 1996. Vol. 53, № 1-2. P. 31-42.
6. Jericho K.W. Experimental infectious respiratory disease in groups of calves: lobar distribution, variance, and sample-size requirements for vaccine evaluation / K.W. Jericho, G.C. Kozub // Can. J. Vet. Res. 2004. Vol.68, №2. P. 118-127.

УДК 612.017.1:576.3

И.Ю. Ездакова, О.М. Чуйко, Е.О. Чадина

Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии РАСХН им. Я.Р.Коваленко

ДИНАМИКА РОЗЕТКООБРАЗУЮЩИХ КЛЕТОК КУР В ОНТОГЕНЕЗЕ

Интенсификация промышленного птицеводства и неблагоприятная экологическая обстановка приводят к нарушению иммунной реактивности организма, снижению эффективности вакцинопрофилактики. В связи с этим, исследования, направленные на понимание механизмов формирования иммунной системы птиц и прогнозирование устойчивости к инфекционным заболеваниям, имеют большое значение для повышения рентабельности отрасли.

Как известно, иммунная система птиц состоит из центральных и периферических лимфоидных органов. К центральным относятся тимус и бурса Фабрициуса. На раннем этапе эмбриогенеза фабрициева сумка играет первостепенную роль в антителогенезе. Для больших лимфоцитов бурсы характерен достаточно развитый аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Тимус отличается от этого первичного лимфоидного органа млекопитающих многодольчатой структурой. Размеры тимоцитов кур меньше лимфоцитов фабрициевой сумки. Селезенка и костный мозг относятся к периферическим лимфоидным органам у птиц. В филогенезе впервые у птиц появляются зародышевые центры в селезенке, где происходит дифференцировка лимфоцитов из стволовых клеток (Э.Купер,1980). Костный мозг, аналогично млекопитающим, служит местом формирования клеток крови. Таким образом, количественная динамика клеток лимфоидных органов является важной характеристикой иммунной реактивности организма птиц.

Цель наших исследований - количественная характеристика розеткообразу-

ющих клеток в процессе становления иммунной системы птиц.

Материалы и методы. В эксперименте использовали SPF-цыплят 3-, 9- и 21-суточного возраста по 10 голов в группе; изучали показатели клеточного звена иммунитета в процессе онтогенеза методами розеткообразования. Источниками иммунокомпетентных клеток служили периферическая кровь, тимус, бурса, костный мозг, селезенка.

Выделение мононуклеарных клеток. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из свежевзятой или хранившейся при температуре 4° С не более 10-12 час. крови животных. Для предотвращения свертывания кровь смешивали с антикоагулянтом (раствор гепарина), разводили фосфатным буфером рН 7,2 или физиологическим раствором 1:1.

В пробирку вносили раствор гистопака (Histopaque-1077, Sigma), наслаивали разбавленную кровь и центрифугировали в горизонтальном положении при 3000 об/мин. в течение 30 мин. На границе раздела фаз отбирали взвесь МНК, разбавляли клеточную суспензию питательной средой 199 или RPMI-1640, двукратно центрифугировали при 1000 об/мин. по 10 мин. Мононуклеары переносили в пробирку и разводили четырехкратным избытком среды с 5% фетальной сыворотки (ФС). Взвесь МНК смешивали с равным объемом 0,4% раствора трипанового синего. В камере Горяева подсчитывали количество и жизнеспособность неокрашенных клеток. В реакциях использовали суспензию с жизнеспособностью клеток не менее 90%.

Из лимфоидных органов птиц получали суспензию иммунокомпетентных клеток путем измельчения и гомогенизации. Центрифугирование в градиенте плотности, как показано выше, способствовало выделению значительного количества жизнеспособных мононуклеарных клеток, используемых в различных иммунологических реакциях.

Метод розеткообразования основан на том, что на поверхности Т-лимфоцитов птиц расположены CD2-рецепторы, на мембране В-клеток - рецепторы к C_3-компоненту комплемента. При взаимодействии индикаторных частиц с гомологичными молекулами образуются структуры, имеющие форму розеток. В качестве индикаторных частиц используются эритроциты барана и комплекс зимозана с C_3-компонентом комплемента.

Для определения розеткообразующих рецепторов применяли:

- суспензию МНК (2-1х10^6 кл/мл) в 1 мл среды RPMI-1640 с 5% ФС;
- 0,5% суспензию эритроцитов барана (ЭБ) в RPMI-1640 с 5% ФС;
- 0,1% раствор зимозана А с комплементом (ЗC_3-комплекс).

Равные объемы суспензии МНК, ЭБ или ЗC_3-комплекса смешивали и инкубировали 20 мин при t 20°-22° С. Полученную смесь центрифугировали при 1200 об/мин. в течение 5 мин., инкубировали 18 час. при 10°-12° С. Клетки фиксировали 0,6% раствором глютарового альдегида (20 мин.), трехкратно отмывали дистиллированной водой, центрифугировали при 1200 об/мин. по 5 мин. Суспензию клеток наносили на предметное стекло; препарат фиксировали метиловым или этиловым спиртом 10 мин., окрашивали азур В-эозином в течение 20 мин. Под микроскопом (х400) подсчитывали не менее 200 лимфоцитов, на поверхности которых обнаруживали от 3 и более эритроцитов барана или частиц зимозана, определяли процент розеткообразующих клеток.

Теофиллиновый тест (Караулов А.В.,2002). Раствор теофиллина, рН 7,2. 1,8 мг теофиллина растворяли в 1 мл теплой среды для культивирования клеток, при изменении рН добавляли 0,1 N раствор NaOH. Предварительно в суспензию клеток вносили 0,2 мл раствора теофиллина в среде RPMI-1640 (готовится ex tempore) и инкубировали в течение часа при 37^{0}С. Последующий ход реакции аналогичен методу розеткообразования. Тфр-РОК - количество розеткообразующих клеток в пробе с теофиллином.

Результаты исследований и обсуждение.

В результате проведенных исследований установлено изменение экспрессии Е-розеткообразующего рецептора и мембранного антигена, взаимодействующего с С3-компонентом комплемента в зависимости от возраста SPF-цыплят.

В период от 3 до 21 суточного возраста изменяется количество основных популяций лимфоцитов в периферической крови птиц. (рис.1).

При определении относительного содержания Т- и В-лимфоцитов методом спонтанного розеткообразования установлено, что в крови SPF –цыплят (возраст – 3 суток) содержится 26,1% Т-лимфоцитов (Е-РОК), 16,5% В-лимфоцитов (ЗС-РОК), теофиллин-резистентных клеток (Тфр-РОК) – 23,0%. В возрасте 9 суток в крови было обнаружено 9,0% Е-розеткообразу-

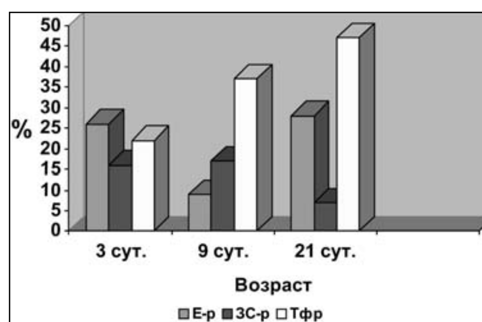


Рис. 1. Модуляция поверхностных рецепторов лимфоцитов в крови SPF-цыплят в процессе онтогенеза

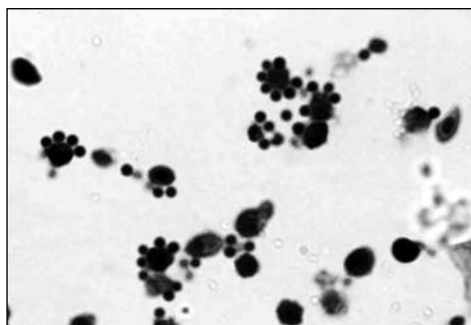


Рис. 2. Теофиллинрезистентные клетки костного мозга SPF-цыплят (х900)

ющих клеток, 17,0% - В-лимфоцитов (ЗС-РОК) и 37,0% – Тфр-РОК. В костном мозге – 40,0% Е-розеткообразующих клеток и 10,0% Тфр-РОК, тимусе – 40,3% , бурсе – 35,0% Е-РОК.

У птицы 21-дневного возраста зарегистрировано 28,3% Е-РОК, 7,0% ЗС-РОК, 47,0% Тфр-РОК в периферической крови, бурсе 22,3% Е-РОК и 34,5% ЗС-РОК, селезенке 28,3% Е-РОК и 40,1% ЗС-РОК, костном мозге 32,5% Е-РОК и 10,5% ЗС-РОК.

В результате проведенных исследований установлено, что в фабрициевой сумке SPF-цыплят присутствуют Т-лимфоциты, количество которых снижается с 9-ти до 21-дневного возраста. Число В-клеток с рецепторами к комплементу в бурсе составляет 34,5%. В костном мозге птиц в возрасте 9 суток 30,0% составляют теофиллин-чувствительные клетки, являющиеся аналогом цитотоксических клеток, и 10% – теофиллинрезистентные (Т-хелперы). У цыплят 21-дневного возраста в костном мозге Т-клеток в три раза больше, чем В-клеток.

Как видно из диаграммы (рис. 1), в течение 19 суток увеличивается количество теофиллин-резистентных клеток в крови птиц. Как известно, теофиллин воздействует на мембрану лимфоцитов, провоцируя образование розеткообразующих рецепторов, в основном, на незрелых Т-лимфоцитах (Хаитов Р.М. и соавт., 1995)

Следует отметить, что подопытные цыплята были свободны от патогенных агентов и присутствие в крови значительного количества незрелых Т-лимфоцитов никогда не встречавших антигена вполне объяснимо (рис. 2).

На примере SPF-птиц показано, что розеткообразующая активность клеток изменяется в процессе онтогенеза. Мы полагаем что, рецепторная модуляция поверхности лимфоцитов характерна для периода иммунного созревания организма. Поэтому иммунная система птиц раннего возраста не способна адекватно реагировать на вакцинацию, что следует учитывать при разработке схем специфической профилактики.

РЕЗЮМЕ

Была изучена количественная динамика Т- и В-лимфоцитов методами розеткообразования. Показано, что количество розеткообразующих клеток изменяется у цыплят от 3 до 21-суточного возраста. Мы полагаем, что рецепторная модуляция поверхности лимфоцитов характерна для периода иммунного созревания организма.

SUMMARY

The quantitative dynamics of the T- and B-lymphocytes has been studied by the methods of the E-, ZC- and Tr- rosette-formation. It has been demonstrated that the quantity of rosette-forming cell changed from 3 to 21 days aged. We think that receptor's modulation on a surface of the lymphocytes is characteristically for the period of the immune maturation.

Литература

1. Купер Э. Сравнительная иммунология. 1980, М.: Мир, 422 с.
2. Караулов А.В. Под ред. Клиническая иммунология и аллергология. М: МИА, 2002, 651 с.
3. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. 1995, М: ВНИРО, с. 122-124